

TREBALL DE RECERCA: DEPARTAMENT DE MEDICINA UAB 2010-2011
(convocatòria juny)

TÍTOL:

Prova de la diferencia de potencial nasal pel diagnòstic de Fibrosi Quística.

ALUMNE-Autora : MONTSERRAT BOSQUE GARCIA
MBosque@tauli.cat

Director de la línia de recerca del teu treball de recerca:

Nom i Cognoms : **Christian Domingo i Ribas**
Càrrec hospitalari i/o universitari Professor Associat Departament de Medicina

Índex

| | |
|--|----------------|
| Introducció | pag. 3 |
| Avantatges e inconvenients dels mètodes diagnòstics habituals | pag. 3 |
| Mesura de la diferència de potencial nasal | pag. 4 |
| Dispositiu | pag. 5 |
| Material fungible | pag. 6 |
| Calibració del voltímetre | pag. 7 |
| Preparació del malalt | pag. 7 |
| Procediment de mesura | pag. 8 |
| Objectius | pag. 9 |
| Material i mètodes | pag. 9 |
| Avaluació estadística | pag. 11 |
| Resultats | pag. 11 |
| Conclusions i comentaris | pag. 12 |
| Bibliografia | pag. 13 |
| Annex 1 | pag. 15 |

Introducció

La Fibrosi Quística (FQ) és la malaltia genètica més freqüent en la raça blanca (1,2). Amb una prevalença de 1:1.500-2.000 entre tots els nounats d'Europa Central i EUA A Catalunya la xifra és de 1:5.750-1600 nounats vius (3). Des de 1985 se sap que el gen de la FQ està localitzat en el braç llarg del cromosoma 7, però no va ser fins a 1989 quan un grup canadenc va especificar el defecte genètic de l'afecció.. Anàlisis seqüencials del gen han pogut identificar més de 1.800 mutacions relacionades amb la FQ (4). La freqüència i els tipus de mutacions varien en funció de les races i ètnies.

L'anormal funcionament del gen de la FQ repercuteix en la proteïna de membrana "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator "(CFTR), que actua com un canal de clor que es pot activar a través de la adenosinmonofosfat cíclic (AMPc) donant una impermeabilitat al clor de la membrana cel·lular en epitelis ciliats en malalts de FQ. El seu anormal funcionament fa que s'excretin menys ions clor a l'exterior de la cèl·lula i que es reabsorbeixen més ions sodi, la qual cosa condiciona, d'una banda, la concentració iònica del moc i, en conseqüència, estableix una anormal diferència de potencial entre l'interior i l'exterior de les cèl·lules afectades. Existeixen també altres canals de clor alternatius, que s'activen pel calci intracel·lular i que es comporten en individus amb FQ igual que en persones sanes, si bé no són capaces de compensar de manera absoluta la secreció de clor. En pacients amb FQ s'observa una major diferència de potencial nasal (DPN) per aquesta excessiva reabsorció de sodi, amb pèrdua de valències positives en la llum bronquial, el que duu a una major negativització dels valors de la DPN respecte al interstici en comparació dels individus sans. La CFTR s'expressa en les cèl·lules epitelials del pulmó, pàncrees, glàndules sudorípares i conductes deferents, on produeixen alteracions concordants amb la clínica de la malaltia, els trastorns del transport iònic poden també repercutir de forma diferent en els diferents òrgans.

Avantatges e inconvenients dels mètodes diagnòstics habituals.

Fins a la introducció de la prova de criatge neonatal per a la FQ, la majoria dels pacients (el 71% en EUA) s'establia el diagnòstic de FQ durant el primer any de vida i en un 8% dels pacients no s'establia el diagnòstic fins als 10 anys d'edat. El diagnòstic diferencial, des del punt de vista respiratori, inclou altres entitats com immunodeficiències primàries, discinesia ciliar primària o la síndrome de Young (1,5). Clàssicament, per arribar al diagnòstic de FQ, es realitza l'anàlisi del contingut d'ions sodi i clor de la suor per estimulació amb pilocarpina; és la denominada "prova de la suor", desenvolupada per Gibson i Cooke en 19596 (8).

Una prova de la suor normal no exclou de forma definitiva la malaltia. En un 10% dels adolescents sans s'obtenen valors de la suor alterats, per poder discriminar als pacients amb FQ, s'ha de poder valorar la funció de la CFTR, la mesura de la DPN, s'ha mostrat útil per mesurar aquesta funció. Aquest fet ha motivat una sèrie de canvis en els criteris diagnòstics de

FQ en el consens de 1998 (10). Gràcies a l'increment de l'índex de sospita de la malaltia, la possibilitat d'estudiar la funció de la CFTR amb la prova de la mesura de la DPN, juntament amb un millor i major desenvolupament tècnic dels estudis genètics, que ha fet possible detectar un nombre creixent de mutacions noves e inusitades del gen de la FQ que en el passat no es tipificaven com característiques de la malaltia. S'ha obert unes expectatives diagnòstiques a malalts amb clínica compatible, però con fenotípicament complerta i prova de la suor normal o al límit, que podria correspondre al 2% dels pacients(2) En aquests casos, sense cap prova de la funció de la CFTR; la demostració de mutacions de FQ en el gen de la CFTR (estudi genètic lent i costós) permet el diagnòstic definitiu.

Per aquest motiu es va desenvolupar la recerca d'un nou mètode per al diagnòstic de la FQ que fos més sensible i específic en la demostració in vivo d'un transport iònic anormal a causa de un comportament patològic. Això ha obligat a canviar el concepte d'aquesta malaltia i a considerar que la FQ comprèn un espectre clínic molt ampli, augmentant el nombre de diagnòstics de FQ en un nombre creixent d'adults. La determinació de la DPN s'ha introduït recentment en l'Estat espanyol i sembla cada vegada es més útil en l'enfocament diagnòstic de la FQ donada la seva elevada sensibilitat, especificitat i valor pronòstic (11).

Avui dia en molts països el diagnòstic de FQ, es realitza ja, en el període neonatal, gràcies a les tècniques de criatge neonatal, per la determinació de la tripsina immunorreactiva en sang, confirmant-se amb la detecció de 2 mutacions en l'estudi genètic i/ o per 2 proves de la suor positives. Encara que la majoria d'aquests lactants estan lliures de símptomes en el moment del criatge neonatal, experimentaran en el futur manifestacions clíniques pròpies de FQ.

Mesura de la diferència de potencial nasal.

Interès clínic.

En els últims anys la capacitat per a detectar mutacions en el gen de la FQ i per a mesurar les propietats bioelèctriques transepitelials que són la conseqüència directa d'aquestes mutacions, ha ampliat enormement l'espectre de la FQ. En 1981 el grup de treball dirigit per Knowles (12) va desenvolupar una tècnica per a diagnosticar la FQ, el denominat mesura de la diferència de potencial transepitelial nasal (DPN).

L'epiteli ciliat respiratori (inclòs l'epiteli nasal) regula la composició de fluids de la superfície de les vies respiratòries mitjançant el transport actiu d'ions sodi i clor. Aquest transport iònic genera una diferència de potencial transepitelial que pot mesurar-se in vivo, s'expressa en milivoltios (mV), depèn de la concentració dels diferents ions i és negativa respecte a la submucosa. La submucosa de tots els epitelis respiratoris és isoelectrica, igual que el teixit cel·lular subcutani. Per això és possible prendre com valor de referència (per a establir una diferència de potencial transepitelial) qualsevol teixit subcutani en zones del cos humà de fàcil accés.

Les anormalitats del transport iònic en l'epiteli respiratori de pacients amb FQ s'associen amb un patró de DPN que és diferent del d'individus normals.

Aquesta és la raó fonamental per a l'ús del DPN com ajuda diagnòstica. Específicament 3 trets distingeixen a la FQ:

1. Major valor absolut de diferència de potencial – el valor de fet és més negatiu –, la qual cosa reflecteix un transport de sodi augmentat a través d'una membrana cel·lular relativament impermeable al clor. Un valor absolut de DPN basal ostensiblement elevat és patognomònic de FQ. En individus sans els valors se situen en al voltant de -20 mV i en els malalts afectats de FQ són majors de -50 mV.
2. Major reducció de la diferència de potencial després de perfusió nasal amb un inhibidor del canal de sodi (amilorida), la qual cosa reflecteix la inhibició del transport accelerat de sodi típic dels pacients amb FQ (13,14). Les substàncies bloquejadores dels canals de sodi com la amilorida impedeixen de forma selectiva el flux d'ions de sodi en cèl·lules epitelials després de la inhalació nasal. AL romandre els ions sodi en el costat luminal de l'epiteli ciliat, s'arriba a un augment de la càrrega positiva en aquesta zona, amb disminució dels valors absoluts de DPN (que de fet reflecteixen una menor negativitat).
3. Canvi mínim o absència de canvi de la DPN en resposta a la perfusió de la superfície epitelial nasal amb una solució lliure de clor en conjunció amb un betaagoniste (isoproterenol o fenoterol), la qual cosa reflecteix la falta de secreció de clor intervinguda per la CFTR (14,15). A través dels simpaticomimètics que produeixen l'activació de adenilciclasa i de l'AMPc s'aconsegueix una estimulació de clor en els individus sans, però no en el pacients amb FQ.

Dispositiu:

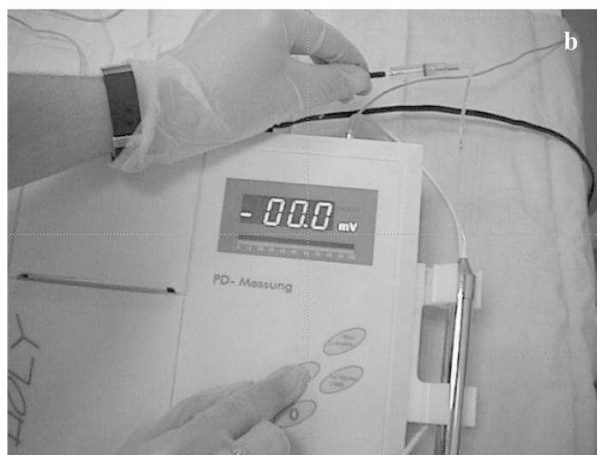
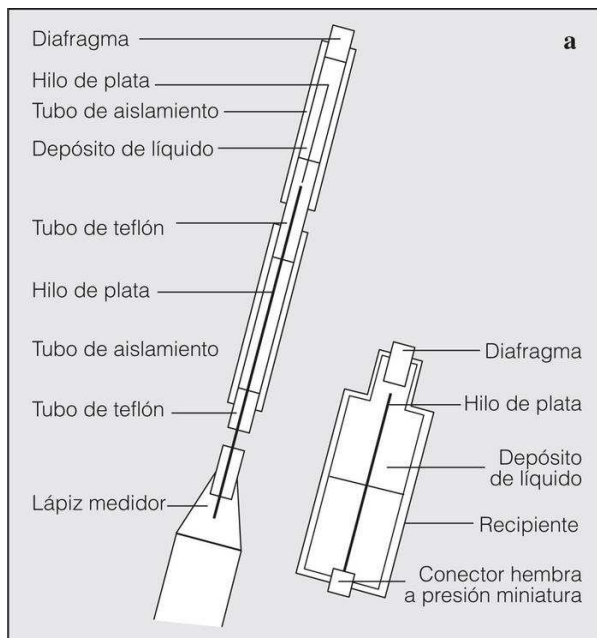
Per realitzar correctament la tècnica es precisa un voltímetre d'alta impedància degudament validat. Knowles va descriure el dispositiu inicial i posteriorment Hofmann, dirigit per Lindermann, va desenvolupar un dispositiu simplificat (Tholy-Medicap®, Ulrichstein, Germany) (16,17)

El dispositiu que utilitzem doncs, es el Tholy-Medicap®, Ulrichstein, Germany, que es un voltímetre d'alta impedància que precisa d'un elèctrode de mesura per la presa de la senyal bioelèctrica, que es col·loca a la superfície de l'epiteli nasal, i un elèctrode de referència subcutani. Es un aparell compacte i portàtil, que es pot fer servir a on hi hagi una presa de corrent elèctrica. A més del voltímetre, l'aparell conté: un registrador controlat per un microprocessador, amb una memòria integrada dels valors mesurats, i una impressora tèrmica per enregistrar i documentar els valors mesurats.

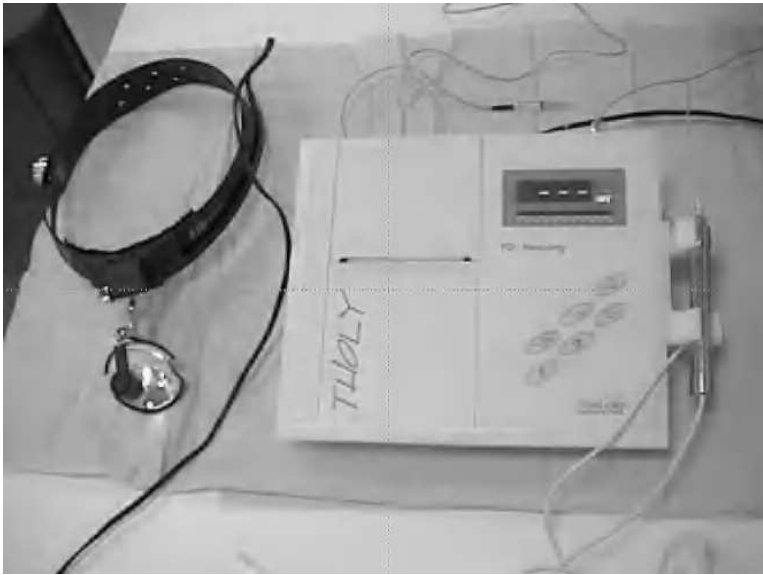
Material fungible

- Dispositiu :Tholy, Medicap®

- Dos elèctrodes de plata/clorur de plata (Figura 1):
 - a. Elèctrode de mesura col·locat al llapis mesurador. Els elèctrodes es conserven tubs de plàstic plens d'una solució de clorur de plata saturada. Després de cada us, aquesta solució es substituïda per una nova solució de clorur de plata.
 - b. Elèctrode de referència, més petit de tamany, que connecta l'extrem a un catèter subcutani intravenós, que es col·loca a l'avantbraç. Perfundit amb Ringer.
- Espèculum nasal de ORL amb una font de llum freda (Storz, Germany).(Figura 2)
- Paper d'impresió tèrmic que porta incorporat el Dispositiu Tholy
- Solució Ringer.
- Apòsit per fixar el catèter, coto, alcohol per desinfecció i xeringues.



(Figura 1)



(Figura 2)

Calibració del voltímetre

Abans de cada mesura, s'ha d'efectuar la calibració del voltímetre, i s'ha de comprovar la eficàcia i l'estabilitat dels elèctrodes utilitzats. (figura 1)

El procediment es el següent: es posen en contacte els extrems dels elèctrodes de referència i de mesura per crear un curtcircuit, d'aquesta forma el voltímetre no detectarà corrent; si succeeix aquest fet, els elèctrodes es consideren aptes i el voltímetre ben calibrat. Es possible que la pantalla registri un valor d'uns pocs milivolts; llavors s'ha de pulsar el botó: "0" per equilibrar els elèctrodes assegurant-se de que estan en contacte.

Després de tornar els elèctrodes a 0, la pantalla tindrà que mostrar un valor de 0 mV quan els elèctrodes estiguin en contacte

Preparació del malalt:

El pacient s'ha de trobar relaxat, assegut en un butaca còmode, en posició de la barbeta recolzada en un optímetre, que permeti la sortida de les perfusions, sense molestar al pacient. S'ha d'inspeccionar i explorar les dues narius. Si el malat patís una afecció aguda del nas, s'haurà de retardar la prova una setmana.

Es col·loca l'elèctrode de referència en una nariu, de 0.5 cm a 2cm de profunditat, entre el cornet inferior i la base del nas.

En la cara externa de l'avantbraç del pacient, un cop desinfectat, es col·loca el catèter de referència, connectat a un catèter subcutani que s'introdueix al teixit, adipós subcutani, es perfundeix amb una solució de Ringer.

I s'inicia el procediment de mesura.

Procediment de mesura :

La DPN mesura la diferència de potencial entre el catèter col·locat al nas i el de referència a l'espai subcutani.(19).

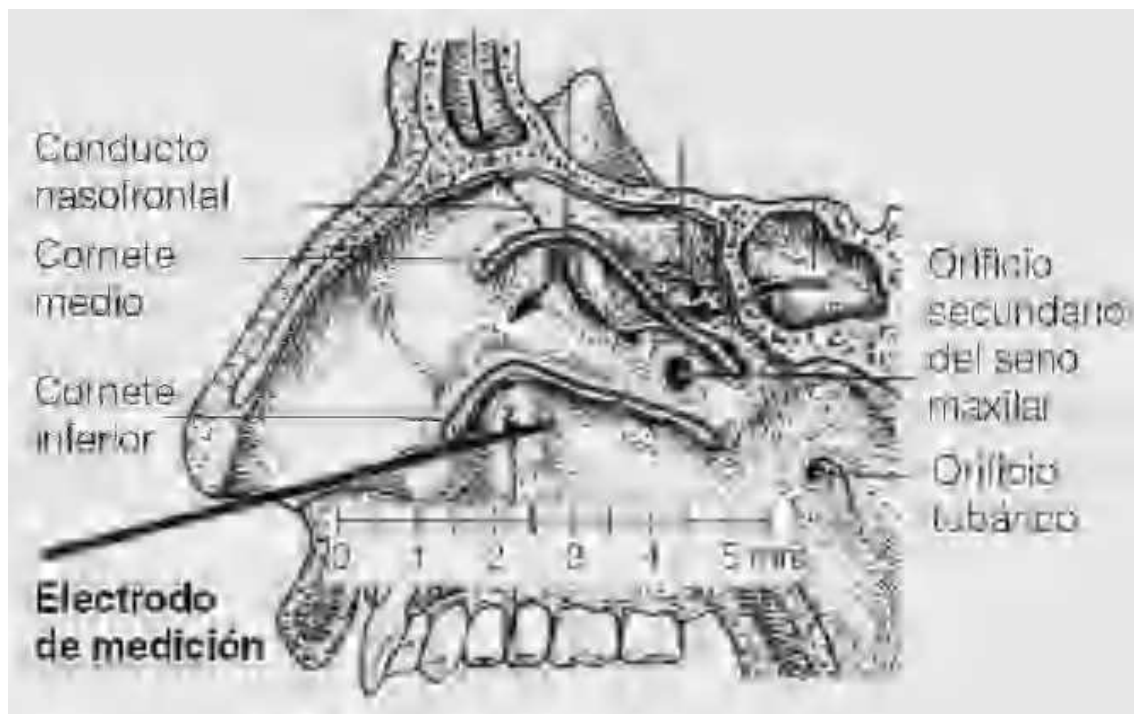
Primer es connecta el dispositiu, a la corrent, es connecten els elèctrodes al dispositiu, es calibra el voltímetre i es passa a efectuar la mesura del DPN.

El pacient se seu a una butaca amb braços i se l'hi inspecciona el nas, tal com hem explicat a l'apartat.

A l'avantbraç, es posa el catèter subcutani, perfundit amb solució de Ringer, connectat a l'elèctrode de referència que va connectat al voltímetre. Immediatament a la pantalla del dispositiu Tholy, ha d'aparèixer un valor de DPN, de pocs mV, que al mobilitzar el catèter han de variar lleugerament.

L'elèctrode de mesura es posa entre el cornet inferior i la base nasal, a una distància de 0.5 cm a 2 cm, amb l'ajut d'un espèculum de ORL il·luminat amb llum freda. Aquesta posició es a on la lectura es màxima i mes estable (figura 3 i 4)

Es comprova la correcta posició de l'elèctrode, al tocar la part posterior del cornet inferior amb l'elèctrode de mesura, la pantalla ha d'indicar valors entre -5 mV i -10mV. Assolint que aquests valors es mantinguin durant un minut. Es fixa immediatament.



(Figura 3)



(Figura 4)

1.-Objectius :

- 1.- Determinar els valors de DPN en el grup de malalts afectats de FQ, en el grup de portadors de la malaltia i en el grup de bronquièctasis difuses no filiades.
- 2.-Validar l'eficàcia de la diferència de potencial nasal (DPN) per fer el diagnòstic de la fibrosi quística (FQ) en els malats de la nostra àrea geogràfica de referència.

2.- Material i mètodes:

Població:

Varem estudiar 84,individus dividits en 5 grups:

Grup A: controls sans

Grup B: pacients pediàtrics amb diagnòstic de FQ

Grup C: pacients adults amb bronquièctasis difuses no filiades amb prova de la suor negativa i portadors de 1 mutació CFTR

Grup D: Pacients adults amb bronquièctasis difuses no filiades,amb prova de la suor negativa i no portadors de mutacions CFTR

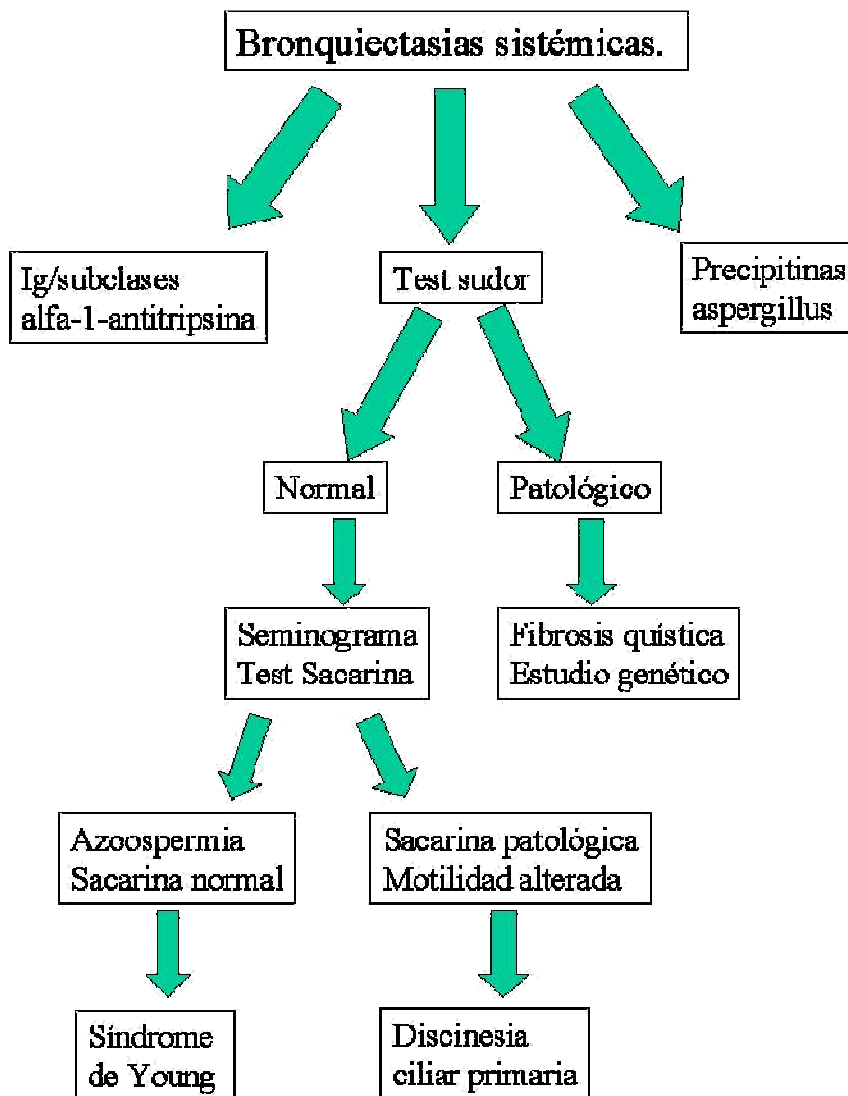
Grup E: Portadors sans d'una mutació de CFTR

Metodologia:

Instrumentalització: protocol bronquiectasis del Servei de pneumologia Parc Taulí

- Avaluació radiològica: Rx de tòrax, Rx de sins i TACHR (TAC d'alta resolució)
- Prova de la sacarina
- Determinació: alfa 1-antitripsina, Immunoglobulines i subclasses de la IgG
- Serologia Aspergillus
- Seminograma
- Biòpsia nasal
- Prova de la suor
- Estudi genètic

D'acord als següents algoritmes (veure taula 1)



(Taula 1)

Si un pacient després d' estar sotmès al protocol de l'estudi de les bronquièctasi, no estava filiat. On i havia una sospita de FQ, es passava a la determinació del DPN.

Determinació del DPN: en un voltímetre: THOLY Medicap, connectat a 2 elèctrodes, 1 de referència al teixit subcutani, a l'avantbraç i l'altre de mesura a la nariu. Només determinàvem els valors basals. No fèiem les determinacions amb les perfusions, que hem citat en els apartats anteriors.

Varem efectuar 4–6 determinacions de PDN basal a cada malalt: un total de 450 determinacions, 225 a la nariu dreta i 225 determinacions a la nariu esquerra, quedava ben palès la capacitat del tècnic.

Valor final, mitja aritmètica dels 2 valors d'ambdues narius.

Considerant valors de normalitat de DPN de -20 mV i pacients amb FQ: -50mV

Prova de la suor: a tots els pacients i als controls sans se'ls hi va determinar 2 proves de la suor en 2 períodes de temps diferents.

Prova de la suor patològica > 80 meq Cl, valors límits entre 50 i 80 meq Cl. Determinació per bioquímica del Clor a la suor.

Estudi genètic: A tots els pacients se'ls hi va determinar un estudi genètic pel Gen de la CFTR. Els malalts del grup A: controls sans, Rx de tòrax normal, Rx de Sins normal, Proves de la Suor normals, Estudi genètic normal.

Els malalts del grup B i C: eren malalts amb bronquièctasis difuses idiopàtiques, seguint el protocol diagnòstic abans esmentat.

A tots els pacients se'ls hi va determinar un de 4 a 6 determinacions de DPN (2 a cada nariu).

Avaluació estadística:

- 1.- es va realitzar amb el paquet estadístic SPSS
- 2.- els resultats s'expressen en forma de: MEDIA +/- DS
- 3.- la comparació entre grups: ANOVA amb la correcció de Bonferroni
- 4.- es va determinar el valor predictiu positiu(VPP) i negatiu(VPN), especificitat (E) i sensibilitat (S) del DPN

3.-Resultats:

Estudi genètic i prova de la suor del grup de bronquiectasis amb 1 mutació: 4 pacients

| | Prova de la suor | mutació |
|----------|------------------|----------|
| Malalt 1 | 45 meq CL | Q178K/- |
| Malalt 2 | 40 meq Cl | W1282X/- |
| Malalt 3 | 79 meq Cl | 1807M/- |
| Malalt 4 | 71 meq Cl | R1162L/- |

Pel DPN:

Sensibilitat: 91.7 %

VPP: 78 %

VPN: 92.3 %

Resultats del DPN entre grups:

| grups | A | B | C | D | E |
|-------|------------|--------------|-------------|---------------|---------------|
| Nº | 15 | 13 | 4 | 30 | 22 |
| PDN | -25+/-22,1 | -62,1+/-16,7 | -63,4+/-7,9 | -46,7+/-16,02 | -42,59+/-15,6 |

ANOVA, evidencia diferències estadísticament significatives intergrups, l'anàlisi posterior amb la correcció de Bonferroni, va demostrar una diferència estadísticament significativa ($p < 0.05$) entre els grups B/D i B/E.

4.- CONCLUSIONS I COMENTARIS:

La sensibilitat i la especificitat són elevades

Un valor normal de DPN, ens permet descartar amb seguretat FQ, donat el elevat valor predictiu negatiu.

En els nens afectes de FQ, el DPN, ha resultat tant sensible com la prova de la suor pel diagnòstic.

En les bronquièctasis no filiades el DPN, ha estat més sensible que la prova de la suor, el que ens ha permès un canvi de diagnòstic dels pacients.

Hem pogut comprovar que 4 malats amb bronquièctasis no filiades, portadors de 1 mutació CFTR, tenen valors de DPN, pràcticament superponibles al grup de FQ, amb prova de la suor amb valors límits.

I comentàvem que es necessitava un protocol estandaritzat, de mesura del DPN, amb un cuidadós entrenament dels tècnics.

Aquests 2 últims comentaris ja estan aconseguits, doncs, el DPN ja està protocol·litzat i estandaritzat.

5.-Bibliografía

1. Domingo Ribas C, Roig Cutillas J. Discinesia ciliar primaria. Med Clin (Barc). 1991;97:144-6.
2. Rosenstein BJ. What is cystic fibrosis diagnosis? Clin Chest Med. 1998;19:423-41.
3. Garner S, Cobos N, Asensio O, Bosque M, Seculi JL. Newborn screening in Catalonia. Ped Pulmonol. 2003;35 Suppl 10:325.
4. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium: population variation of common cystic fibrosis mutations. Hum Mutat. 1994;4:167-77.
5. Domingo C, Mirapeix RM, Encabo B, Roig J, López D, Ruiz J. Clínica y ultraestructura de la discinesia biliar primaria y el síndrome de Young. Rev Clin Esp. 1997;197:100-3.
6. Rosenstein BJ, Langbaum M. Diagnosis. En: Taussig LM, editor. Cystic fibrosis. Stuttgart, New York: Thieme-Straton Inc.; 1984.p. 85-114.
7. Wheeler WB, Colton HR. Cystic fibrosis: current approach to diagnosis and management. Pediatr Rev. 1988;9:241-8.
8. Wood RE, Boat TF, Doershuk CF. Cystic fibrosis: state of the art. Am Rev Respir Dis. 1976;113:833-78.
9. LeGrys VA. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. J Pediatr. 1996;129:892-7.
10. Rosenstein BJ, Cutting G, for the cystic fibrosis foundation consensus panel. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. J Pediatr. 1998;132:589-95.
11. Bosque M, Larramona H, Asensio O, Montón C, Luján M, Domingo C. Papel del potencial diferencial nasal en el diagnóstico de fibrosis quística con test del sudor negativo. Arch Bronconeumol. 2003;39 Supl 2:137.
12. Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. Science. 1983;221:1067-9.
13. Gowen CW, Lawson EE, Gingras-Leatherman J, Gatzky JT, Boucher RC, Knowles MR. Increased nasal potential difference and amiloride sensitivity in neonates with cystic fibrosis. J Pediatr. 1986;108:517-21.
14. Duperrex O, Berclaz PY, Bertrand D, Lacroix JS, Pochon N, Belli D, et al. A new device for *in vivo* measurement of nasal transepithelial potential difference in cystic fibrosis patients and normal subjects. Eur Respir J. 1997;10:1631-6.
15. Middleton PG, Geddes DM, Alton EW. Protocols for *in vivo* measurement of the ion transport defects in cystic fibrosis nasal epithelium. Eur Respir J. 1994;7:2050-6.
16. Knowles M, Paradiso AM, Boucher RC. *In vivo* nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. Hum Gene Ther. 1995;6:445-55.

17. Hofmann T, Böhmer O, Hüls G, Terbrack HG, Bittner P, Klingmüller V, et al. Conventional and modified nasal potential-difference measurement in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1908-13.
18. Ahrens RC, Standaert TA, Launspach J, Han SH, Teresi ME, Aitken ML, et al. Use of nasal potential difference and sweat chloride as outcome measures in multicenter clinical trials in subjects with cystic fibrosis. *Ped Pulmonol*. 2002;33:142-50.
19. D. Schüler .Basic Protocol for measurement of transepithelial Nasal Potential Difference (NPD) Provided through: The European Working Group on CFTR Expression. Kersting U *J Appl Physiol*, May 1, 2003; 94 (5): 2043-2050

Annex 1.

Annex 1
CERTIFICAT DEL DIRECTOR O CO-DIRECTOR DEL
TREBALL DE RECERCA

Christiam Domingo Ribas, Professor Associat del Departament de Medicina de la
Universitat Autònoma de Barcelona,

FA CONSTAR,

que el treball titulat " Prueba de la diferencia de potencial nasal para diagnóstico de
fibrosis quística " ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat M^a Montserrat
Bosque García, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball
d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina
Interna/Diagnòstic per la Imatge (curs 2010-2011), a la convocatòria de juny 2011.

Barcelona, 12 de maig de dos mil onze.

